

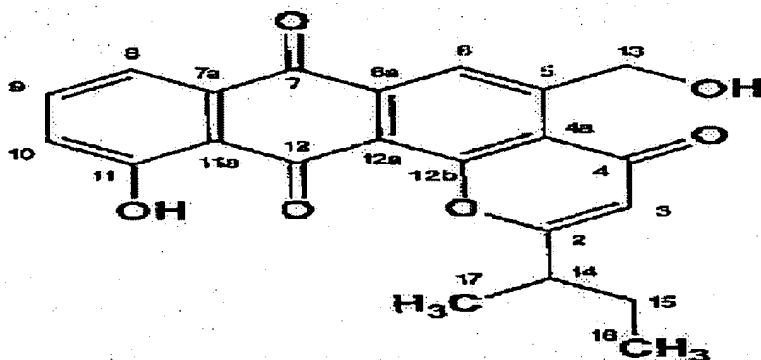
NEUROPROTECTIVE SUBSTANCE CU39, ITS PRODUCTION AND USE

Patent number: JP9295976
Publication date: 1997-11-18
Inventor: SETO HARUO; ARAYA KAZUO
Applicant: KIRIN BREWERY CO LTD
Classification:
- International: C07D311/78; A61K31/35; C12P17/06
- european:
Application number: JP19960110806 19960501

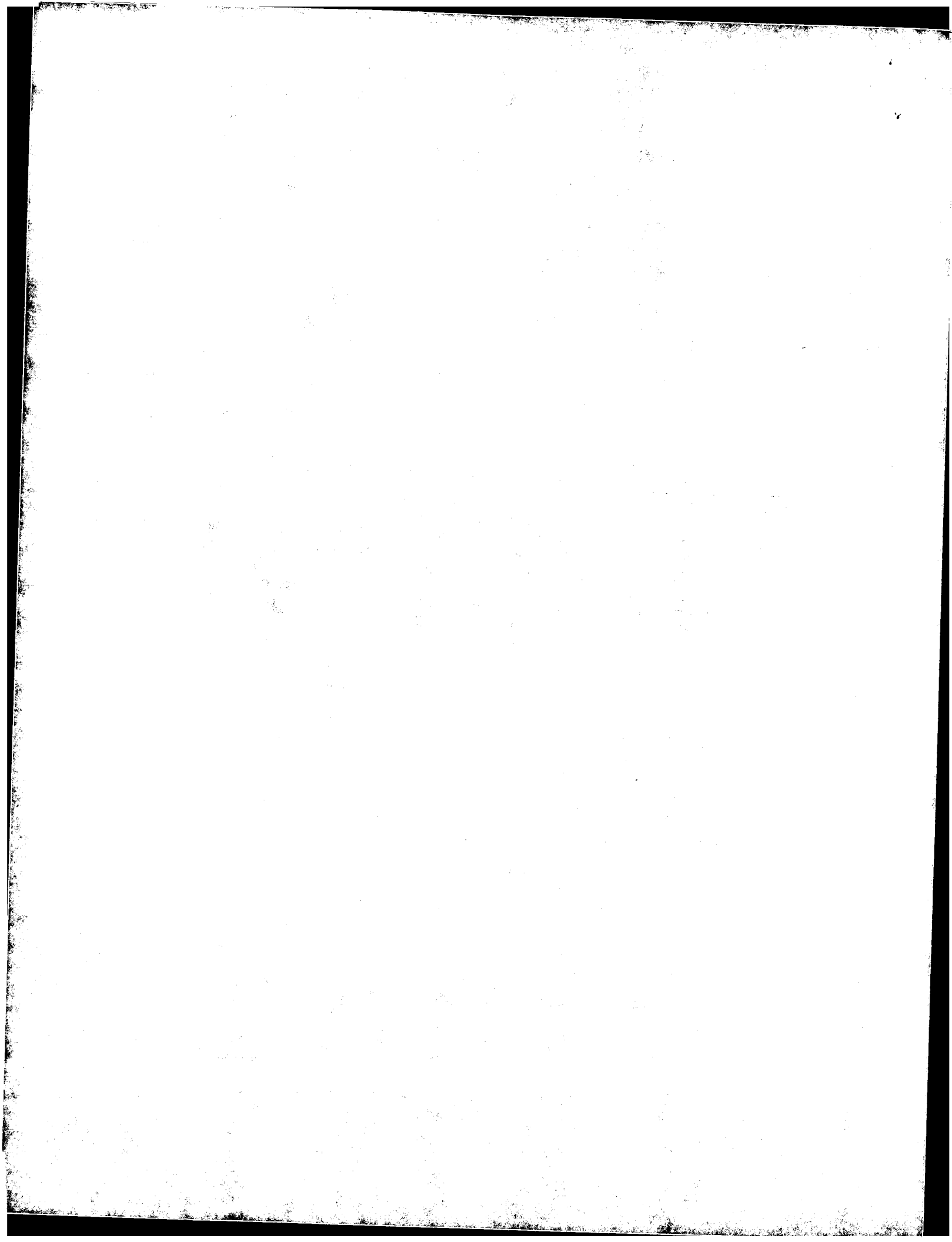
Abstract of JP9295976

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject new compound having inhibitory activity against glutamic acid toxicity, and useful as a neurocyte protective agent, cerebrocyte degeneration inhibitor or cerebrocyte necrosis inhibitor.

SOLUTION: This new compound cu39 (salt) is shown by the formula, and obtained by culturing cu39-productive bacteria belonging to the genus *Streptomyces*: *Streptomyces* sp. cu39 strain (FERM BP-482). This compound has the following physicochemical properties: appearance: yellow powder; melting point : 184-186 deg.C; solubility: readily soluble to ethyl acetate, acetone, chloroform, methanol, ethanol; Rf number: 0.2 (CHCl₃ : MeOH=50:1); HRFAB-MS spectrum: 379, 1182 (calculated); specific rotatory power:[α]_D²¹ =2.5 (c=0.02, MeOH); and molecular formula: C₂₂ H₁₈ O₆ . The dose of the cu39 is 0.1-100mg per day per adult.



Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-295976

(43) 公開日 平成9年(1997)11月18日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 D 311/78			C 0 7 D 311/78	
A 6 1 K 31/35	AAM		A 6 1 K 31/35	AAM
C 1 2 P 17/06			C 1 2 P 17/06	
// (C 1 2 P 17/06				
C 1 2 R 1:465)				

審査請求 未請求 請求項の数7 OL (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願平8-110806

(22) 出願日 平成8年(1996)5月1日

(71) 出願人 000253503

麒麟麦酒株式会社

東京都中央区新川二丁目10番1号

(72) 発明者 瀬戸 治 男

東京都八王子市上野町100

(72) 発明者 新家 一 男

東京都足立区足立1-5-7-703

(74) 代理人 弁理士 佐藤 一雄 (外2名)

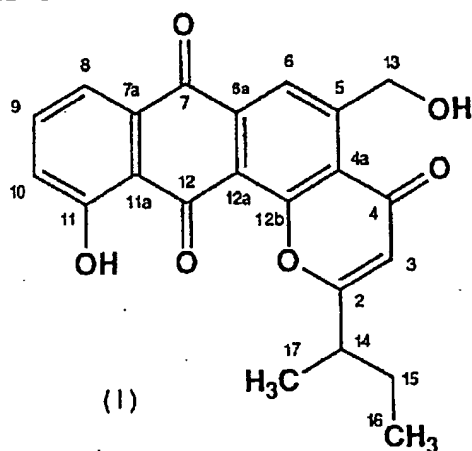
(54) 【発明の名称】 神経保護作用物質 c u 39、その製造法および使用

(57) 【要約】

【課題】 神経細胞保護剤として有効な化合物を提供する。

【解決手段】 次式 (I) で示される化合物 c u 39 またはその塩。

【化1】



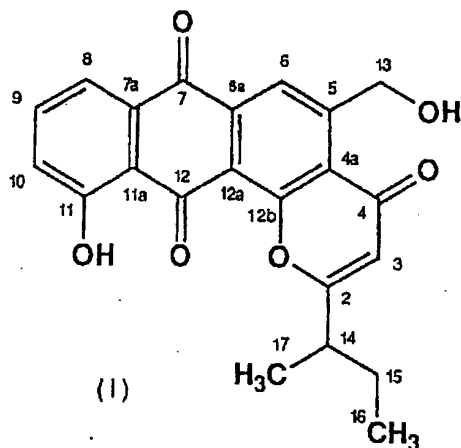
ストレプトミセス属に属し、化合物 c u 39 の生産能を有する c u 39 生産菌を培養し、培養物から c u 39 を採取することを特徴とする上記式 (I) で示される化合物 c u 39 の製造法。上記の化合物 c u 39 またはその塩を含有してなる医薬組成物、特に神経細胞保護剤、脳細胞変性抑制剤もしくは脳細胞壊死抑制剤。

【効果】 化合物 c u 39 は神経細胞保護作用を有しており、特に神経細胞保護剤、脳細胞変性抑制剤もしくは脳細胞壊死抑制剤として有用である。

【特許請求の範囲】

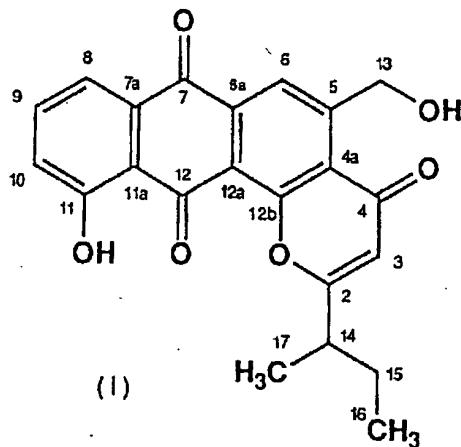
【請求項1】次式(I)で示される化合物cu39またはその塩。

【化1】



【請求項2】ストレプトミセス属に属し、化合物cu39の生産能を有するcu39生産菌を培養し、培養物からcu39を採取することを特徴とする、次式(I)で示される化合物cu39の製造法。

【化2】



【請求項3】cu39生産菌がストレプトミセス・エスピーcu39株(FERM BP-5482)である、請求項2の製造法。

【請求項4】請求項1に記載の化合物cu39またはその塩を有効成分として含有してなる医薬組成物。

【請求項5】請求項1に記載の化合物cu39またはその塩を有効成分として含有してなる神経細胞保護剤。

【請求項6】請求項1に記載の化合物cu39またはその塩を有効成分として含有してなる脳細胞変性抑制剤。

【請求項7】請求項1に記載の化合物cu39またはその塩を有効成分として含有してなる脳細胞壊死抑制剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】〔発明の背景〕

【発明の属する技術分野】本発明はグルタミン酸毒性の抑制作用を有し、神経細胞保護作用を有する新規生理活性物質cu39、その製造法および使用に関する。

【0002】

【従来の技術】脳梗塞、脳卒中、心拍動の停止、脳損傷などから生じる脳虚血、あるいは酸素欠乏症により引き起こされる脳神経細胞の変性および壊死は、興奮性アミノ酸であるグルタミン酸、アスパラギン酸が原因であると考えられている。現在までこれら脳神経細胞の変性および壊死を抑制する手段として、グルタミン酸の拮抗剤の探索に多くの努力が払われてきたにもかかわらず、有効で満足すべき薬剤が今なお見出し得ないのが現状である。

【0003】〔発明の概要〕

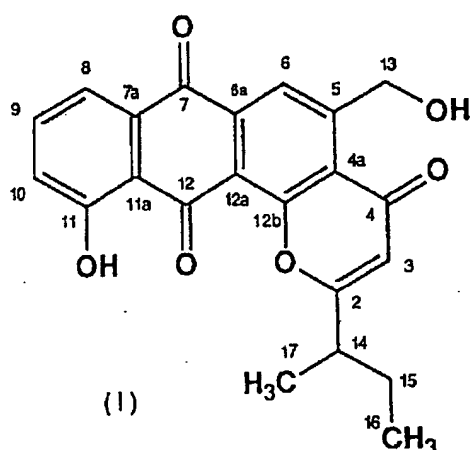
【発明が解決しようとする課題】本発明は上記の希求に応え、グルタミン酸の毒性による細胞壊死の抑制に有効な化合物を創製し、特に神経細胞保護剤として有用な化合物を提供することを目的とするものである。

【0004】

【課題を解決するための手段】N-18-RE-105細胞系(neuroblastoma-primary retina hybrid cells)に対してグルタミン酸を添加すると、シスチンの細胞内取り込みが阻害され、それにともないグルタチオンの細胞内濃度の減少を引き起こし、細胞の酸化ストレス、すなわち細胞内の活性酸素、過酸化物の蓄積を生じさせ、その結果、細胞の変性、壊死をもたらすと考えられている(Neuron, 2, 1547(1989)、J. Pharmacol. Exp. Ther., 250, 1132(1989))。本発明者等はこの評価系を用い、グルタミン酸に起因する細胞壊死を抑制する化合物を鋭意探索した結果、新規生理活性物質cu39が細胞壊死を抑制する作用を有することを見出し、この知見に基づきさらに検討を加えて本発明を完成させるに至った。

【0005】すなわち、本発明による新規化合物は下式(I)で示されるものである。本発明はまた、この化合物の製造法にも関する。すなわち、本発明による下式(I)で示される化合物cu39の製造法は、ストレプトミセス属に属し、化合物cu39の生産能を有するcu39生産菌を培養し、培養物からcu39を採取することを特徴とするものである。本発明は更に、この化合物の用途、具体的には医薬組成物、特に神経細胞保護剤、脳細胞変性抑制剤および脳細胞壊死抑制剤に関する。すなわち、本発明による上記医薬は、下式(I)で示される化合物cu39またはその塩を有効成分として含有してなるものである。

【化3】



【0006】〔発明の具体的説明〕

【発明の実施の形態】

新規化合物cu39

上記式(I)で示される新規化合物cu39は、後述のようにグルタミン酸毒性の抑制作用を有し、神経細胞保護作用を有する新規生理活性物質である。このような特性により、本発明の化合物cu39は医薬組成物、特に脳神経細胞の変性による疾患の予防剤もしくは治療剤として有用である。

【0007】1) 化学構造

本発明の新規化合物cu39は、該cu39のプロトン核磁気共鳴スペクトル、炭素13核磁気共鳴スペクトル、紫外外部吸収スペクトル、赤外部吸収スペクトル、及び質量分析スペクトルを詳細に検討した結果、決定されたものである。

【0008】2) 物理化学的性質

(1) 外観 黄色粉末

(2) 融点 184~186℃

(3) 溶解性 酢酸エチル、アセトン、クロロホルム、メタノール、エタノールに易溶。

(4) Rf値 0.2 (CHCl₃:MeOH=50:1), Merck Kieselgel 60 F₂₅₄

(5) HRFAB-MSスペクトル (m/z)

観測値 379.1198 (M+H)⁺

計算値 379.1182

(6) 比旋光度 [α]²¹_D (c 0.02, MeOH) -2.5°

(7) 紫外外部吸収スペクトル

図1 (MeOH) および図2 (MeOH+NaOH) に示す。

λ_{max} MeOH nm (ε) 208 (15,400), 239 (28,100), 266 (13,500), 406 (4,700)

λ_{max} MeOH+NaOH nm (ε) 240 (24,100), 328 (4,500), 517 (2,500)

(8) 赤外部吸収スペクトル (KBrディスク法)

図3に示す。

ν_{max} (cm⁻¹) 3490, 1675 (sh), 1650, 1585, 1460, 1275, 1220

(9) プロトン核磁気共鳴スペクトル (500メガヘルツ、重DMSO中)

図4に示す。データは第1表にまとめられている。

(10) 炭素13核磁気共鳴スペクトル (125メガヘルツ、重DMSO中)

図5に示す。データは第1表にまとめられている。

(11) 分子式 C₂₂H₁₈O₆

【0009】

第 1 表

No.	δ _C	δ _H	No.	δ _C	δ _H
2	172.5		11	161.3	
3	110.6	6.35	11a	116.7	
4	178.3		12	187.0	
4a	124.0		12a	119.7	
5	153.3		12b	155.6	
6	118.7	8.47	13	62.2	5.13
6a	136.0		14	38.0	2.73
7	181.5		15	26.7	1.89 1.73
7a	132.1		16	11.4	0.92
8	118.7	7.67	17	17.6	1.37
9	136.6	7.76	11-OH		12.68
10	124.7	7.37	13-OH		5.66

【0010】式(1)で示される化合物cu39は、—OHの位置において塩基付加塩があり得る。本発明化合物cu39は、この付加塩をも包含するものである。塩基付加塩としては、例えば、アルカリ金属化合物(例えば水酸化ナトリウム、水酸化カリウムなど)との塩、アルカリ土類金属化合物(例えば水酸化カルシウム、水酸化マグネシウムなど)との塩、アンモニウム塩、有機塩基(例えばトリエチルアミン、エタノールアミンなど)との塩をあげることができる。なお、塩基付加塩を医薬として使用する場合には、塩基は薬学上許容されるものでなければならないことは言うまでもない。

【0011】化合物cu39の製造

本発明の化合物cu39は、以下で詳説するような微生物の培養法により得ることができるが、このような方法に限定されることなく合目的な任意の方法、例えば、類縁化合物の合成化学的または微生物学的修飾によって製造することも、あるいは全合成化学的に製造することも可能であろう。また、遺伝子工学的手法によることも可能であろう。すなわち、化合物cu39の生産に関与する遺伝子を微生物に組み込み、得られた形質転換体を培養し、この培養物から目的化合物を分離して得ることも可能であろう。微生物の培養法による場合には、菌株としては、例えばストレプトミセス属に属し、cu39生産能を有するものを使用しうる。具体的には、下記で詳説するところの、本発明者等の単離に係わるストレプトミセス・エスピーcu39株が、cu39生産能を有する菌株であることが本発明者によってこの度明らかにされたことから、この菌を好ましく用いることができる。その他の菌株としては、グルタミン酸に起因する細胞壊死抑制能を指標として抗生物質生産菌単離の常法に従って自然界から単離したものが用いられる。また、ストレプトミセス・エスピーcu39株を含め、各種cu39生産菌を放射線照射、その他の変異処理に付してcu39生産能を高めることもできるであろう。こうして得られた変異菌株は、いずれも以下で詳説する培養法による本発明の化合物cu39の製造において好ましく用いることができる。

【0012】<cu39株>化合物cu39の生産能を有するストレプトミセス属に属する一菌株で、本発明者等が自然界(長野県根羽村の土壌)から単離して得たcu39株の菌学的性質は、以下のとおりである。

1) 形態

cu39菌株は、グリセロール・アスパラギン寒天培地、スターチ無機塩寒天培地、チロシン寒天培地、栄養寒天培地、イースト・麦芽寒天培地及びオートミール寒天培地上で、菌の生育は良好である。しかし、このなかで菌糸の着生も良好な培地は、スターチ無機塩寒天培地及びイースト・麦芽寒天の2培地のみである。グリセロール・アスパラギン寒天培地、栄養寒天培地及びオートミール寒天培地は菌の生育は良好であるが、菌糸の着生

は乏しい。また、シュクロース・硝酸塩寒天培地は菌の生育及び菌糸の着生も乏しい。基生菌糸より生じた気菌糸は、単純分枝をなして伸長し、数多くの胞子が連鎖する。その形態は、直線上、ループ、およびゆるい螺旋状を呈する。通常、胞子の連鎖は50個以上で、形は卵型で、大きさは $1.1 \sim 0.6 \mu\text{m} \times 0.6 \sim 0.5 \mu\text{m}$ であり、その表面はこぶ状である。胞子嚢、鞭毛胞子、菌核等の特殊形態は、認められない。

2) 各種培地上の生育状態

cu39株を各種培地に27℃、3週間培養した結果は、第2表に示す通りである。

3) 生理的性質

cu39株の生理的性質は、第3表に示す通りである。

4) 炭素源の利用性

cu39株の炭素源の利用性(アリドハム・ゴトリーブ寒天培地上)は第4表に示す通りである。

5) ジアミノピメリン酸の分析

細胞壁構成アミノ酸の一つであるジアミノピメリン酸を分析した結果、L-ジアミノピメリン酸が検出された。以上の菌学的性状から、cu39株は、ストレプトミセス属の一菌株と判断され、以下のような特徴を有する。

(1) 胞子鎖は直線状〜ループ〜ゆるい螺旋状で、胞子の表面はこぶ状である。

(2) 気菌糸はスターチ無機塩寒天培地およびイースト・麦芽寒天培地上で、良く着性する。また、その色は明るいオリーブ灰で、裏面の色は暗い黄茶及び暗い赤茶色である。

(3) チロシン寒天培地、ペプトン・イースト・鉄寒天培地、及びトリプトン・イースト液体培地でメラニン様色素が認められる。可溶性色素はいずれの培地でも認められない。

(4) 糖の利用性は、L-アラビノース、D-キシロース、D-グルコース、D-フラクトース、シュクロース、イシノール、L-ラムノース、ラフィノース及びD-マンニトールで陽性である。

【0013】上記性状より、cu39株はストレプトミセス属に属すると考えられる。ストレプトミセス属の既知菌種について、生理的性質、糖の利用性、及び菌体の色及び形状等を文献、ISP(インターナショナル・ストレプトミセス・プロジェクト)の記載(E.B. Shirling and D. Gottlieb: Int. J. Syst. Bact. 18巻(1968); 19巻(1969); 22巻(1972)について検索したが、該当する種がなかった。そこでcu39菌株をストレプトミセス・エスピー(*Streptomyces* sp.) cu39とする。尚、cu39菌株は工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託申請され、平成8年3月22日、FERM BP-5482として受託されている。

【0014】

第 2 表

培地	生育	気菌糸	裏面色	可溶性色素
シュクロース・ 硝酸塩寒天培地	貧弱	なし	うす黄茶	なし
グルコース・アス パラギン寒天培地	中程度	貧弱 にぶ黄茶	明るい茶	なし
グリセロール・アス パラギン寒天培地	良好	貧弱 黄味灰	にぶ赤味橙	なし
スターチ無機塩 寒天培地	良好	豊富 明るいオリーブ灰	うす黄色 ～暗い黄茶	なし
チロシン 寒天培地	良好	中程度 黄色白～明るい茶灰	明るい茶 ～暗い赤茶	なし
栄養寒天培地	良好	貧弱 黄味白	黄茶	なし
イースト・麦芽 寒天培地	良好	豊富 明るいオリーブ灰	暗い赤茶	なし
オートミール 寒天培地	良好	貧弱 明るいオリーブ灰	明るい茶 ～黄味白	なし

【0015】

第 3 表

生育温度範囲	15～40℃
メラニン様色素 チロシン寒天培地	陽性
ペプトン・イースト・鉄寒天培地	陽性
トリプトン・イースト液体培地	陽性
スターチの加水分解	陰性
ゼラチンの液化	陽性

脱脂乳の凝固

陰性

脱脂乳のペプトン化

陽性

硝酸塩の還元能

陰性

【0016】第4表

Ｌ-アラビノース	+
Ｄ-キシロース	+
Ｌ-グルコース	+
Ｄ-フラクトース	+
シュクロース	+
イノシトール	+
Ｌ-ラムノース	+
ラフィノース	+
Ｄ-マンニトール	+

【0017】＜培養／ $c u 39$ の生産＞化合物 $c u 39$ は、ストレプトミセス属に属する $c u 39$ 生産菌を適当な培地で好氣的に培養し、その培養物から目的物を採取することによって製造することができる。培地は、 $c u 39$ 生産菌が利用しうる任意の栄養源を含有するものであり得る。具体的には、例えば、炭素源としてグルコース、ガラクトース、麦芽糖、およびグリセロールなどが使用でき、窒素源として大豆粉、魚粉、綿実粕、乾燥酵母、酵母エキスをおよびコーンステーパーリカーなどの有機物ならびにアンモニウム塩または硝酸塩、例えば、硫酸アンモニウム、硝酸ナトリウムおよび塩化アンモニウムなどの無機塩が利用できる。また、必要に応じて、塩化ナトリウム、塩化カリウム、炭酸カルシウムのほか、各種リン酸塩、重金属塩などの無機塩類を添加することができる。醗酵中の発泡を抑制するために、常法にしたがって適当な消泡剤、例えばシリコン油を添加することもできる。

【0018】培養方法としては、抗生物質の生産の場合に一般的に行われている方法と同様に、好氣的液体培養法が最も適している。培養温度は $20 \sim 30^{\circ}\text{C}$ が適当であるが、 $25 \sim 30^{\circ}\text{C}$ が好ましい。この方法での $c u 39$ の生産量は、震盪培養、通気攪拌培養ともに培養5日目頃に最高に達する。このようにして $c u 39$ の蓄積された培養物が得られる。培養物中では、 $c u 39$ はその一部は菌体外（すなわち、培養液中）に存在するが、その大部分は菌体中に存在する。

【0019】このような培養物から $c u 39$ を採取するには、合目的な任意の方法が利用可能である。その一つの方法は抽出の原理に基づくものであって、具体的には、菌体外（すなわち、培養液中）の $c u 39$ についてはこれを水不混和性の $c u 39$ 用溶媒（前記参照）、例えば、酢酸エチルなどで抽出する方法、あるいは、菌体内の $c u 39$ については浮過、遠心分離などで得た菌体集合体をメタノール、エタノール、アセトンなどで処理して回収する方法などがある。菌体を分離せずに培養物そ

のままを上記の抽出操作に付すこともできる。適当な溶媒を用いた交流分配法も抽出の範疇に含めることができる。培養物から $c u 39$ を採取する他の方法は、吸着の原理に基づくものであって、既に液状となっている $c u 39$ 含有物、例えば培養液あるいは上記のようにして抽出操作を行うことによって得られる抽出液を対象として、適当な吸着剤、例えばシリカゲル、活性炭、合成吸着剤（例えば、「ダイヤイオンHP20」（三菱化学社製））などを用いて目的の $c u 39$ を吸着させ、その後、適当な溶媒にて溶離させることによって $c u 39$ を得ることができる。このようにして得られた $c u 39$ 溶液を減圧濃縮乾固すれば、 $c u 39$ 粗標品が得られる。

【0020】このようにして得られる $c u 39$ の粗標品をさらに精製するためには、上記の抽出法および吸着法に、ゲル浮過、高速液体クロマトグラフィなどの操作を必要に応じて適宜組み合わせる必要回数実施すればよい。例えば、シリカゲルなどの吸着剤、「セファデックスLH-20」（ファルマシア社製）などのゲル浮過剤を用いたカラムクロマトグラフィ、シリカゲルなどの吸着剤を用いた薄層クロマトグラフィ、「CAPCELL PAK」（資生堂社製）、「ODS」などのシリカ系充填カラム（順相あるいは逆相カラム）を用いた高速液体クロマトグラフィ、あるいは向流分配法を適宜組み合わせる必要回数実施すればよい。化合物 $c u 39$ の純品を得ることができる。本発明による化合物 $c u 39$ は、常法によって前記したような塩基付加塩の形にすることができる。

【0021】化合物 $c u 39$ の用途

本発明の化合物 $c u 39$ は、後述のように、グルタミン酸に起因する細胞壊死を強く抑制する作用を示した。従って、本発明の化合物 $c u 39$ およびその塩の有効な対象疾患としては、たとえば脳梗塞、脳卒中、心拍動の一次停止、脳損傷から生じる脳虚血、酸素欠乏症により引き起こされる諸症状、脳内新生物質や外傷圧による頭蓋内圧上昇にともなう諸症状、さらに脳浮腫や痴呆症などの疾病などがあげられ、本発明の化合物 $c u 39$ およびその塩は、これらの疾病の予防または治療に用いることができる。すなわち、本発明は有用な脳卒中予防剤もしくは脳卒中後遺症治療剤、とりわけ脳神経細胞保護作用、脳細胞変性作用および脳細胞壊死抑制作用を有する薬剤を提供する。従って、本発明による化合物 $c u 39$ は上記疾病の予防剤または治療剤としての医薬（医薬組成物）、特に神経細胞保護剤、脳細胞変性抑制剤もしくは脳細胞壊死抑制剤として使用することができる。

【0022】医薬として使用する場合の本発明化合物 $c u 39$ は、合目的な任意の投与経路、具体的には、動

物の場合には腹腔内投与、皮下投与、静脈または動脈への血管内投与および注射による局所投与などの方法が、またヒトの場合は静脈内投与、動脈内投与、注射による局所投与、腹腔、胸腔への投与、経口投与、皮下投与、筋肉内投与、舌下投与、経皮吸収、または直腸投与により投与することができる。本発明化合物を薬剤として投与する場合は、投与方法、投与目的によってきまる適当な剤型、具体的には、注射剤、懸濁剤、錠剤、粉末剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤、軟膏剤、クリーム剤、座剤等の形態で投与することができる。経口または直腸内投与の場合は徐放化製剤の形態で用いてもよい。これらの製剤を製造するには、化合物cu39に悪影響を与えない限り、製薬上許容される種々の補助剤、すなわち担体あるいはその他の助剤、具体的には溶剤、可溶化剤、等張化剤、防腐剤、無痛化剤、乳化剤、抗酸化剤、賦形剤、結合剤、滑沢剤、安定剤等を必要に応じて添加することができる。溶剤としては、例えば水、生理食塩水等が、可溶化剤としては、例えばエタノール、ポリソルベート剤が、等張化剤としては例えばブドウ糖、生理食塩水、D-ソルビトール、D-マンニトール等が、防腐剤としては例えばベンジルアルコール、パラオキシ安息香酸イソプロピル、パラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸ブチル、パラオキシ安息香酸アロピル、パラオキシ安息香酸メチル、安息香酸、チモール、白糖、ハチミツ等が、無痛化剤としては例えばベンジルアルコール、クロルブタノール、リドカイン、プロカイン等が、賦形剤としては、例えば乳糖、デンプン、結晶セルロース、マンニトール、マルトース、リン酸水素カルシウム、軽質無水ケイ酸、炭酸カルシウム等が、乳化剤としては例えばポリソルベート類、ヤシ脂肪酸、メチルセルロース、精製卵黄レシチン、精製ラノリン、ゼラチン、D-ソルビトール等が、抗酸化剤としては例えばアスコルビン酸、クエン酸、酢酸トコフェロール、没食子酸アロピル、天然ビタミンE、大豆レシチン等が、結合剤としては、例えばデンプン、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルセルロース、エチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、アラビアゴム等が、崩壊剤としては、例えばデンプン、カルボキシメチルセルロースカルシウム等が、滑沢剤としては、例えばステアリン酸マグネシウム、タルク、硬化油等が、安定剤としては、例えば乳糖、マンニトール、マルトース、ポリソルベート類、マクロゴール類、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油等があげられる。また、必要に応じて、グリセリン、ジメチルアセトアミド、70%乳酸ナトリウム、界面活性剤、塩基性物質（例えば、エチレンジアミン、エタノールアミン、炭酸ナトリウム、アルギニン、メグルミン、トリスアミノメタン）を添加することもできる。これらの成分を用いて、注射剤、錠剤、顆粒剤、カプセル剤等の剤型に製造することができる。製剤において、本発明化合物cu3

9の含有量は製剤形態により広範囲に変えることが可能である。

【0023】化合物cu39の投与量は、動物実験の結果および種々の状況を勘案して、連続的または間欠的に投与したときに総投与量が一定量を越えないように定められる。具体的な投与量は、投与方法、患者または被処理動物の状況、例えば年齢、体重、性別、感受性、食事（食餌）投与時間、併用する薬剤、患者またはその病気の程度に応じて変化することは言うまでもなく、また一定の条件のもとにおける適量と投与回数は、上記指針をもとにして専門医の適量決定試験によって決定されなければならない。具体的には、成人1日あたり0.1~100mg程度であるが、上記のように年齢、病態、症状の程度に応じて適宜増減されることが望ましい。

【0024】〔実験例〕

【実施例】以下は、化合物cu39の生理活性試験および製造例によって本発明を更に詳細に説明するものである。

〔cu39の生理活性試験〕

(1) 神経細胞系ハイブリドーマN-18-RE-105細胞を用いる活性測定法

i) N-18-RE-105細胞の培養：N-18-RE-105細胞（大阪大学たんぱく質研究所より入手）の培養は、10%FCSおよびHAT (hypoxanthine 0.1mM, aminopterin 40μM, thymidine 0.14mM、シグマ社製)を含むダルベッコ変法MEM (DMEM) 中で、37℃、5%CO₂存在下で行い、3日毎に継代した。

ii) 活性評価試験（検鏡法）：N-18-RE-105細胞が96穴マイクロプレートに6.25×10³ cells/cm²となるように播種した。24時間培養後、終濃度が10mMとなるようにグルタミン酸を添加した。24時間後、顕微鏡下にて細胞の生死を観察した。

iii) 活性評価試験（LDH法）：乳酸脱水素酵素の細胞外への流出量（LDH法）は和光純薬工業株式会社製のLDH-細胞毒性テストワコーを用いて下記のように測定した。グルタミン酸添加24時間後、培養上清と細胞を分離し、細胞を0.5% Triton X-100 (0.1Mリン酸緩衝液、pH7.0) にて処理した。この培養上清と細胞抽出液の乳酸脱水素酵素の活性を測定した。酵素活性の比較は乳酸脱水素酵素の基質50ml (DL-乳酸リチウム緩衝液 (50mg/ml) に溶解したニトロブルーテトラゾリウム、ジアホラーゼ、NAD) に培養上清あるいは細胞抽出液を50ml添加し、室温で45分間放置した後、100mlの1N塩酸で反応を停止させた。その後、マイクロプレートリーダーにより560±10nmの吸光度を測定した。細胞障害率は次式により算出した。

細胞障害率(%) = (S-N) / (P-N) × 100
S: 検体での吸光度

N: ネガティブコントロールでの吸光度

P: ポジティブコントロールでの吸光度

【0025】(2) 結果

本発明の化合物cu39はN-18-RE-105細胞に対するグルタミン酸毒性を抑制した($ED_{50}=40nM$)。

【0026】[cu39の製造]

1) 培養

使用した培地は、KG培地(グルコース 2.5%、大豆粉 1.5%、乾燥酵母 0.2%、 $CaCO_3$ 0.4%; pH6.2)である。上記培地20mlを試験管に入れ、ストレプトミセス・エスピー(*Streptomyces* sp.) cu39株(FERM BP-5482)をスラントより1白金耳接種し、ロータリーシェーカーで27℃にて2日間震盪培養した。上記培地100mlを500mlイボ付き三角フラスコ20本に分注後滅菌したものに前培養液を1mlずつ加え、ロータリーシェーカーで27℃にて5日間震盪培養した。

【0027】2) cu39の採取

上記の条件で培養後、培養液(2リットル)を濾過し、菌体を得た。この菌体を1リットルのアセトンで2回抽出し、抽出液を濃縮後、0.5リットルの酢酸エチルで3回抽出した。抽出液を合わせて無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濃縮乾固した。残渣を少量のクロロホルム:メタノール=50:1に溶解し、シリカゲル(メルク社製、キーゼルゲル60; 200g)のカラム(25mmφ×250mm)に吸着させ、クロロホルム:メタノール=50:1で溶出した。活性画分を濃縮乾固し、残渣を少量のクロロホルム:メタノール=50:1に溶解し、シリカゲルTLCプレート(メルク社製、キーゼルゲル60F₂₅₄、20cm×20cm; 1枚)に吸着さ

せた。クロロホルム:メタノール=50:1で展開し、活性画分をかきとり、クロロホルム:メタノール=50:1で抽出した。濃縮乾固し、残渣を少量のクロロホルム:メタノール=1:1に溶解し、セファデックスLH-20(ファルマシア社製)のカラム(15mmφ×400mm)に載せ、クロロホルム:メタノール=1:1で溶出した。活性画分を濃縮乾固し、残渣を少量の85%MeOHに溶解し、ODS(テガシ社製)のカラムを用い、移動相として85%MeOHを毎分3mlで送液して高速液体クロマトグラフィーを行った。その結果得られたcu39を含む分画を減圧濃縮乾固し、30mgの精製cu39を得た。

【0028】

【発明の効果】本発明による化合物cu39は、グルタミン酸の毒性の抑制作用を有し神経細胞保護作用を有しており、医薬組成物、特に神経細胞保護剤、脳細胞変性抑制剤もしくは脳細胞壊死抑制剤として有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1】メタノール中での化合物cu39の紫外線吸収スペクトルを模写したものである。

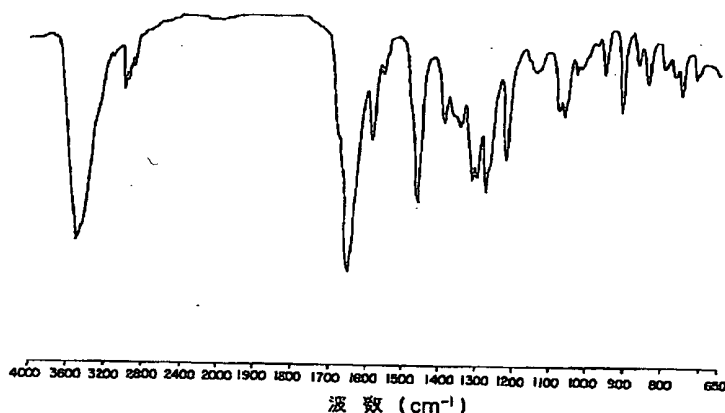
【図2】メタノール中で0.01N NaOHを添加したときの化合物cu39の紫外線吸収スペクトルを模写したものである。

【図3】KBrディスク法による化合物cu39の赤外線吸収スペクトルを模写したものである。

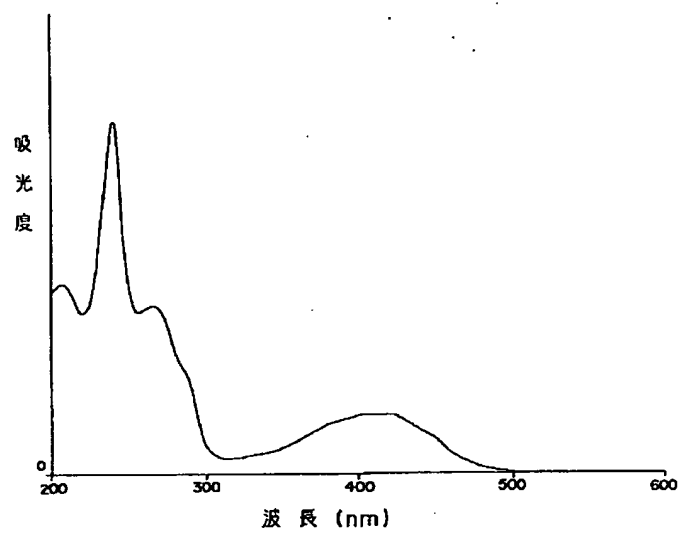
【図4】重DMSO中における化合物cu39の500メガヘルツプロトン核磁気共鳴スペクトルを模写したものである。

【図5】重DMSO中における化合物cu39の125メガヘルツ炭素13核磁気共鳴スペクトルを模写したものである。

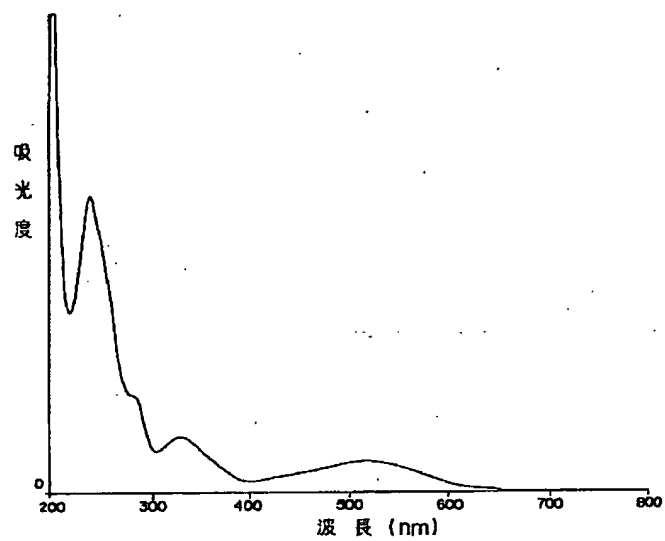
【図3】



【図1】



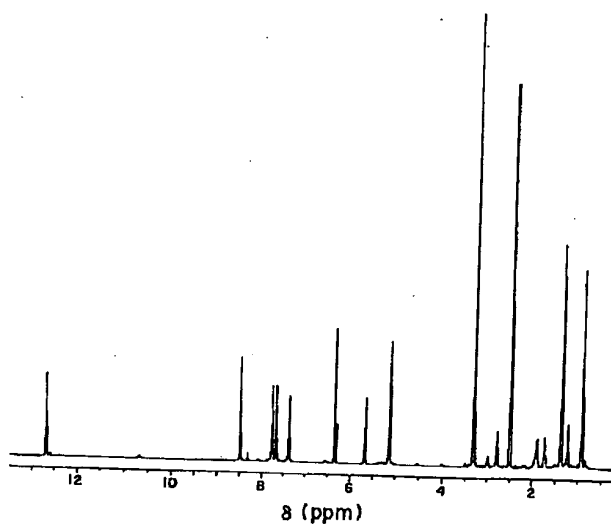
【図2】



(10)

特開平9-295976

【図4】



【図5】

